

PENGARUH LAMA FERMENTASI KOMBUCHA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP DAYA HAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli*

Muhammad Habib Barkah, Dini Sri Damayanti^{1*}, Reza Hakim²

¹Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Kombucha daun sirsak merupakan minuman tradisional hasil fermentasi rebusan daun sirsak dengan bakteri asam asetat *Acetobacter xylinum* dan khamir *Saccharomyces* sp. sehingga menghasilkan rasa yang khas serta memiliki efek antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi kombucha daun sirsak terhadap pH dan daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Metode: Lama fermentasi yang digunakan dalam pembuatan kombucha daun sirsak adalah 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Uji pH dilakukan dengan pH meter elektrik dan Uji Zona Hambat (*Zone of Inhibition*, ZOI) menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi 100% pada tiap perlakuan lama fermentasi terhadap bakteri *Escherichia coli*. Data pengukuran pH dan ZOI pada perbedaan lama fermentasi di analisa menggunakan *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan LSD dengan nilai $p < 0,05$.

Hasil: pH kombucha daun sirsak dgn lama fermentasi 7 hari, 14 hari dan 21 hari didapatkan $4,16 \pm 0,04$; $3,17 \pm 0,03$; $2,41 \pm 0,01$. Semakin lama proses fermentasi terdapat kecenderungan penurunan pH. ZOI kombucha daun sirsak dengan lama fermentasi 7 hari, 14 hari dan 21 hari didapatkan $14,1 \pm 1,92$; $10,7 \pm 0,57$; $9,5 \pm 0,56$ dalam satuan mm. Semakin lama proses fermentasi terdapat kecenderungan penurunan potensi antibakteri dibandingkan kontrol. Potensi antibakteri *Escherichia coli* pada kombucha dengan lama fermentasi 7 hari tidak berbeda signifikan dengan amoksisilin dosis 10 mg/ml dan termasuk dalam kategori kuat.

Kesimpulan: Kombucha dengan lama fermentasi 7 hari merupakan waktu yang paling baik untuk menghasilkan pH 4.16 dan potensi antibakteri *Escherichia coli* dengan kategori kuat.

Kata Kunci: *Annona muricata* L., kombucha daun sirsak, *Zone of Inhibition*, *Escherichia coli*

*Korespondensi:

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

+62-341-578920

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

ABSTRACT

Introduction: Soursop leaf kombucha is a traditional drink fermented soursop leaf stew with acetic acid bacteria *Acetobacter xylinum* and yeast *Saccharomyces* sp. This results in a distinctive taste and antibacterial effect. This study aims to determine the effect of soursop leaf kombucha fermentation time on pH and growth inhibition of *Escherichia coli* bacteria.

Methods: The fermentation time used in making soursop leaf kombucha was 7 days, 14 days and 21 days. The pH test was carried out with an electric pH meter and the Zone of Inhibition (ZOI) test using the well method with a concentration of 100% in each treatment for the duration of fermentation against *Escherichia coli* bacteria. The pH and ZOI measurement data on the difference in fermentation time were analyzed using One Way Anova followed by LSD with $p < 0.05$.

Results: Soursop leaf kombucha pH with fermentation time of 7 days, 14 days and 21 days was $4,16 \pm 0,04$; $3,17 \pm 0,03$; $2,41 \pm 0,01$. The longer the fermentation process there is a tendency to decrease the pH. ZOI of soursop leaf kombucha with fermentation time of 7 days, 14 days and 21 days obtained $14,1 \pm 1,92$; $10,7 \pm 0,57$; $9,5 \pm 0,56$ in mm. The longer the fermentation process, there was a tendency to decrease the antibacterial potential compared to the control. The antibacterial potential of *Escherichia coli* in kombucha with a fermentation time of 7 days was not significantly different from that of amoxicillin at a dose of 10 mg/ml and was included in the strong category.

Conclusion: Kombucha with 7 days of fermentation is the best time to produce a pH of 4.16 and the antibacterial potential of *Escherichia coli* with a strong category.

Keywords: *Annona muricata* L., soursop leaf kombucha, *Escherichia coli*, antibacterial activity.

*Correspondence:

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

+62-341-578920

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan produk minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh yang ditambahkan gula dan SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) yang memiliki cita rasa dan aroma yang khas¹. Kombucha memiliki manfaat sebagai antioksidan, antibakteri, memperbaiki mikroflora usus, dan meningkatkan sistem imun². Kombucha mengandung probiotik, asam-asam organik dan senyawa fenolik³. Manfaat mengonsumsi probiotik adalah mampu meningkatkan pertahanan imunitas non spesifik⁴. Studi oleh Marsh (2014) menunjukkan bahwa probiotik yang dominan ditemukan dalam kombucha tergolong *Lactobacillus*⁵. *Lactobacillus* dapat meningkatkan produksi makrofag dan mengaktifkan fagosit untuk menurunkan agen-agen toksik yang masuk ke dalam tubuh⁶. Bakteri asam laktat akan memproduksi bakteriosin yang memiliki kemampuan bakterisidal⁷.

Kombucha dapat dihasilkan dari herbal yang memiliki kandungan fenol tinggi². Daun sirsak merupakan salah satu herbal yang memiliki kandungan fenol tinggi seperti senyawa steroid/terpenoid, flavonoid, alkaloid, dan tanin, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan kombucha⁸. Senyawa fenol memiliki potensi sebagai antibakteri yang bekerja menghambat sintesis dinding sel pada membran sel, enzim, dan metabolisme yang terdapat pada sel⁹. Daun sirsak jika difermentasikan dengan kultur kombucha akan meningkatkan efek antibakteri⁴.

Kombucha daun sirsak merupakan minuman tradisional rebusan daun sirsak yang ditambahkan gula dan difermentasikan dengan bakteri asam asetat *Acetobacter xylinum* dan khamir *Saccharomyces* sp². Bakteri dan khamir saling bekerja sama untuk membentuk asam dan etanol dari perombakan gula¹⁰. Bakteri dan khamir yang terdapat pada kombucha menggunakan substrat untuk aktivitas metabolik. Khamir menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa melalui invertase dan menghasilkan etanol. Bakteri asam asetat menggunakan glukosa dalam menghasilkan asam glukonat dan etanol untuk memproduksi asam asetat¹¹. Kumar (2016) menyebutkan bahwa akumulasi zat asam selama proses fermentasi akan membuat pH larutan semakin asam yang mempengaruhi aktivitas antibakteri¹².

Pertumbuhan probiotik pada kombucha dipengaruhi oleh lama fermentasi dalam menghasilkan asam organik, bakteriosin, dan meningkatkan senyawa fenolik^{13,14}. Menurut Simanjuntak (2011), perlakuan lama fermentasi 7 hari menghasilkan total asam dan senyawa fenolik paling tinggi¹⁵. Peningkatan kadar senyawa fenolik dan asam organik mempengaruhi aktivitas antibakteri kombucha daun sirsak^{12,16}. Menurut Yanti (2020), kombucha daun sirsak dengan lama fermentasi 12 hari berpotensi sebagai antibakteri dengan diameter daya hambat 16,28 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*². Sedangkan menurut Susilowati (2013) penelitian lama fermentasi 7 dan 14 hari pada teh

kombucha menimbulkan adanya perubahan pH dan total asam¹⁷.

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas kombucha daun sirsak terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode uji difusi sumuran dengan konsentrasi 100% selama 7, 14, dan 21 hari yang dibandingkan dengan kontrol antibiotik dan rebusan daun sirsak, serta pengaruh lama fermentasi kombucha daun sirsak terhadap perubahan nilai pH.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu, dan Tempat Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan desain penelitian *in vitro*. Rancangan penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Escherichia coli* dengan melihat *Zone of Inhibition* (ZOI). Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – Agustus 2021 di Laboratorium Terpadu FK UNISMA dan Laboratorium FK UMM.

Pembuatan Serbuk Daun Sirsak

Daun sirsak diambil pada urutan ke 3 sampai 5 dari pangkal batang. Daun dicuci dan ditiriskan selama 12 jam. Daun selanjutnya dirajang menjadi ukuran yang lebih kecil dan di oven pada suhu 50°C selama 3 jam¹⁸. Daun yang telah kering diblender hingga terbentuk serbuk. Tahapan selanjutnya serbuk daun sirsak dimasukkan ke dalam kantong teh. Setiap kantong diisi sebanyak 8 gram serbuk daun sirsak¹⁹.

Pembuatan Kombucha Daun Sirsak

Tahapan pembuatan kombucha daun sirsak diawali dengan penyediaan rebusan serbuk daun sirsak. Air sebanyak 500 ml direbus hingga mencapai suhu 100 °C. Selanjutnya kantong teh yang telah terisi daun sirsak dimasukkan dan direbus selama 15 menit. Air rebusan kemudian ditambahkan gula sebanyak 10% (b/v) dan dilakukan pengadukan. Larutan daun sirsak dimasukkan ke dalam bioreactor (stoples kaca/jar) steril ditutup rapat dan didinginkan hingga suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$, selanjutnya ditambahkan dengan starter kombucha SCOBY sebanyak 10% (v/v). Jar ditutup dengan serbet kertas dan diikat menggunakan karet, untuk menghindari adanya kontaminasi dari debu, kotoran, dan partikel yang tidak diinginkan. Jar diletakkan pada ruangan yang gelap dan dalam suhu ruang $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 21 hari²⁰. Pengambilan sampel untuk Analisa dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21.

Pengukuran pH Kombucha Daun Sirsak

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter elektrik. Alat ukur pH meter dikalibrasi sebelum dan sesudah pengukuran. Masing - masing larutan kombucha diambil 25 ml dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Ujung elektroda dicelupkan ke dalam sampel cairan kombucha sampai

skalanya konstan²¹. Nilai hasil pengukuran dicatat dan dilakukan pengulangan pengukuran pH 3 kali.

Pembuatan Media Mueller Hinton

Pembuatan media MH ini dengan menambahkan komponen 38 gram kedalam 1 liter akuades. Kemudian diaduk dan dididihkan selama 1 menit hingga semua komponen benar-benar larut. Larutan media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media MHA dituang kedalam cawan petri sebagai media dasar. Pencadang steril dengan diameter 6 mm, diletakkan di atas media dasar yang telah memadat^{2,22,23}.

Pembuatan Larutan Amoksisilin

Pada pengujian ini digunakan kontrol positif yaitu amoksisilin 10 mg/mL dimasukan ke dalam sumuran sebanyak 40 µL. Tablet amoksisilin 500 mg digerus dan dilarutkan dalam 5 ml aquadest steril sehingga didapat konsentrasi 100 mg/ml. Dari larutan 100 mg/ml diambil 1 ml kemudian ditambahkan aquadest steril hingga 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi larutan 10 mg/ml².

Cara Inokulasi Bakteri

Bakteri uji disiapkan dalam bentuk suspensi dalam larutan NaCL 0,85%. Pembuatan bakteri uji dilakukan dengan cara bakteri uji ditumbuhkan pada MHA miring berumur 24 jam diambil sebanyak 1-2 jarum inokulasi (ose) dan disuspensikan ke dalam larutan NaCL 0,85% steril dan disetrakan densitasnya dengan standard Mc.Farland 0,5^{22,23}.

Pengukuran ZOI (Zone of Inhibition)

Suspensi bakteri uji dimasukkan sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi media MHA semi padat yang masih cair dan dihomogenkan, selanjutnya dituang ke dalam cawan petri yang telah diletakkan pencadang. Setelah media semi padat memadat, pencadang dilepas sehingga terbentuk sumuran. Kombucha daun sirsak dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 50 µL. Pengujian ini menggunakan metode difusi agar sumuran. Sumuran (A) ditambahkan kontrol positif Amoksisilin, sumuran (B) ditambahkan kontrol negatif rebusan daun sirsak, dan sumuran (C) ditambahkan larutan kombucha daun sirsak dengan perbedaan lama fermentasi 7, 14, dan 21 hari. Media uji selanjutnya disimpan di kulkas selama 30 menit untuk memberikan kesempatan kombucha sebagai agensia antibakteri berdifusi ke media. Setelah itu, media uji diinkubasi pada suhu 37 C selama 24 jam². Pengujian dilakukan 6 kali pengulangan, pengukuran zona hambat menggunakan aplikasi *image J* dengan satuan mikrometer.

Analisa Data Statistik

Analisa hasil ZOI menggunakan SPSS versi 25. Data ditampilkan dalam nilai rata-rata \pm SD. Data pengukuran pH dan ZOI pada perbedaan lama fermentasi di analisa menggunakan *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan LSD dengan nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Pengukuran pH Kombucha Daun Sirsak

Tabel 1 Hasil Pengukuran pH Kombucha Daun Sirsak

Lama Fermentasi	Sampel	$\bar{X} \pm SD$
0 hari	Rebusan (Kontrol)	5,15 \pm 0,05 ^a
7 hari	Kombucha 1	4,16 \pm 0,04 ^b
14 hari	Kombucha 2	3,17 \pm 0,03 ^c
21 hari	Kombucha 3	2,41 \pm 0,01 ^d

Keterangan: Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran pH kombucha daun sirsak dengan perbedaan lama fermentasi. Analisa statistik menggunakan uji *one way ANOVA* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Tanda (huruf) menandakan adanya perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan hasil perhitungan, pH kombucha daun sirsak memiliki perbedaan yang signifikan pada tiap lama fermentasi. pH kombucha mengalami penurunan (asam) seiring bertambahnya lama fermentasi. pH tertinggi terdapat pada kombucha daun sirsak lama fermentasi 7 hari, sedangkan pH terendah terdapat pada kombucha daun sirsak lama fermentasi 21 hari. pH kombucha daun sirsak lebih rendah secara signifikan dibandingkan pH rebusan daun sirsak.

Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Terhadap Bakteri *Escherichia coli*



Gambar 1: Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 7 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*.

Keterangan: (AB) Amoksisilin 10 mg/ml, (Rebusan) Rebusan Daun Sirsak, (7 hari) Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 7 Hari.

Gambar 1 menunjukkan tidak terbentuknya ZOI pada rebusan daun sirsak, sedangkan amoksisilin dan kombucha daun sirsak lama fermentasi 7 hari menunjukkan terbentuknya ZOI.

Tabel 2 Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 7 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Sampel	$\bar{X} \pm SD$	Kategori
Kombucha	14,1 \pm 1,92 ^a	Kuat
Amoksisilin	13,7 \pm 0,34 ^a	Kuat
Rebusan	0 ^b	-

Keterangan: Tabel 2 menunjukkan hasil pengukuran daya hambat (mm) *Escherichia coli* oleh kombucha daun sirsak lama fermentasi 7 hari dibandingkan dengan amoksisilin 10

mg/ml dan rebusan daun sirsak. Analisa statistik menggunakan uji *one way* ANOVA dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Tanda (huruf) menandakan adanya perbedaan yang signifikan.



Gambar 2: Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 7 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*.

Keterangan: (AB) Amoksisilin 10 mg/ml, (Rebusan) Rebusan Daun Sirsak, (14 hari) Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 14 Hari.

Gambar 2 menunjukkan tidak terbentuknya ZOI pada rebusan daun sirsak, sedangkan amoksisilin dan kombucha daun sirsak lama fermentasi 14 hari menunjukkan terbentuknya ZOI.

Tabel 3 Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 14 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Sampel	$\bar{X} \pm SD$	Kategori
Kombucha	$10,7 \pm 0,57^a$	Kuat
Amoksisilin	$13,0 \pm 0,87^b$	Kuat
Rebusan	0^c	-

Keterangan: Tabel 3 menunjukkan hasil pengukuran daya hambat (mm) *Escherichia coli* oleh kombucha daun sirsak lama fermentasi 14 hari dibandingkan dengan amoksisilin 10 mg/ml dan rebusan daun sirsak. Analisa statistik menggunakan uji *one way* ANOVA dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Tanda (huruf) menandakan adanya perbedaan yang signifikan.



Gambar 3: Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 7 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*.

Keterangan: (AB) Amoksisilin 10 mg/ml, (Rebusan) Rebusan Daun Sirsak, (21 hari) Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 21 Hari.

Gambar 3 menunjukkan tidak terbentuknya ZOI pada rebusan daun sirsak, sedangkan amoksisilin dan kombucha daun sirsak lama fermentasi 21 hari menunjukkan terbentuknya ZOI.

Tabel 4 Hasil Pengukuran ZOI Kombucha Daun Sirsak Lama Fermentasi 21 Hari Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Sampel	$\bar{X} \pm SD$	Kategori
Kombucha	$9,5 \pm 0,56^a$	Lemah
Amoksisilin	$13,5 \pm 0,25^b$	Kuat
Rebusan	0^c	-

Keterangan: Tabel 4 menunjukkan hasil pengukuran daya hambat (mm) *Escherichia coli* oleh kombucha daun sirsak lama fermentasi 21 hari dibandingkan dengan amoksisilin 10 mg/ml dan rebusan daun sirsak. Analisa statistik menggunakan uji *one way* ANOVA dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Tanda (huruf) menandakan adanya perbedaan yang signifikan.

Setelah dilakukan 6 kali pengulangan didapatkan hasil tertinggi pada lama fermentasi 7 hari dengan hasil rerata zona inhibisi $14,1 \pm 1,92$ mm. Adapun hasil terendah didapatkan pada lama fermentasi 21 hari dengan hasil rerata zona inhibisi $9,5 \pm 0,56$ mm. Berdasarkan hasil analisa statistik menunjukkan perbandingan kombucha daun sirsak tiap perlakuan lama fermentasi terdapat perbedaan secara signifikan. Potensi antibakteri kombucha daun sirsak dengan lama fermentasi 7 hari dan amoksisilin dalam kategori kuat. Peningkatan lama fermentasi menyebabkan penurunan potensi antibakteri dibandingkan kontrol amoksisilin. Hasil ini menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak tidak mempunyai ZOI terhadap bakteri *Escherichia coli*.

PEMBAHASAN

Kombucha daun sirsak merupakan minuman tradisional rebusan daun sirsak yang ditambahkan gula dan difermentasikan dengan bakteri asam asetat *Acetobacter xylinum* dan khamir *Saccharomyces* sp. Kombucha mengandung probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan sistem pencernaan²⁴. Komposisi probiotik kombucha tidak dapat dijelaskan secara tepat karena bergantung pada jenis inokulum yang digunakan. Studi oleh Marsh (2014) menunjukkan bahwa bakteri yang dominan ditemukan dalam kombucha tergolong pada *Gluconobacter*, *Lactobacillus* dan *Acetobacter*⁵. Spesies yeast juga banyak ditemukan dalam kombucha seperti *saccharomycodes*, *Schizosazzharmyces Koleckera*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulospora*, *Mycotorula* dan *Mycoderma*²⁵. Yeast dan bakteri yang terdapat pada kombucha menggunakan substrat untuk aktivitas metabolik. Yeast menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa melalui invertase dan menghasilkan etanol¹¹. Bakteri asam asetat menggunakan glukosa dalam menghasilkan asam glukonat dan etanol untuk memproduksi asam asetat.

Asam glukonat dan glukoronat termasuk asam organik yang paling banyak diproduksi dari proses fermentasi kombucha. Asam laktat juga ditemukan meskipun bukan merupakan komponen khas dari kombucha tradisional²⁶.

Aktivitas antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau mungkin membunuh bakteri. Aktivitas antibakteri salah satunya dapat diukur dengan metode sumuran. Kelebihan menggunakan metode sumuran yaitu lebih mudah mengukur zona hambat karena isolat beraktivitas sampai ke bawah dan pada metode sumuran terjadi proses osmolaritas yang lebih tinggi dari metode cakram, sehingga dapat menghasilkan zona hambat yang besar, sedangkan kekurangannya adalah sulitnya proses perlakuan^{27,28,29}. Pengukuran daya hambat dengan melihat terbentuknya diameter zona bening Menurut kriteria yang diusulkan David & Stout (1971) daya hambat bakteri berdasarkan diameter zona bening terbagi sangat kuat (zona bening lebih dari 20 mm), kuat (zona bening 10-20 mm), sedang (zona bening 5-10 mm), dan lemah (zona bening kurang dari 5 mm)³⁰.

Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap pH Pada Kombucha Daun Sirsak

Hasil menunjukkan adanya pengaruh fermentasi kombucha terhadap perubahan pH. Semakin lama proses fermentasi menyebabkan nilai pH semakin rendah secara signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan terdapat produk asam selain etanol yang dihasilkan selama proses fermentasi, sehingga dapat menurunkan pH kombucha daun sirsak. Menurut Purwoko (2007) selama proses fermentasi tidak hanya menghasilkan etanol dan karbondioksida, namun juga terdapat gliserol dan asam asetat³¹. Hasil serupa disampaikan oleh Taherzadeh (2007), bahwa selama proses hidrolisis atau fermentasi akan terbentuk asam asetat³². Selain itu, selama proses fermentasi akan terbentuk asam laktat hasil metabolit primer bakteri asam laktat yang terdapat dalam SCOBY³¹.

Bakteri asam laktat akan menguraikan piruvat menjadi asam laktat pada keadaan anaerob. Piruvat hasil glikolisis berperan sebagai akseptor elektron dari NADH, NADH akan melepaskan elektron dan ditangkap oleh piruvat terbentuklah asam laktat³³. Selama proses fermentasi asam-asam organik dibentuk oleh mikroba kombucha daun sirsak (*Acetobacter xylinum* & *Saccharomyces* sp.). Khamir akan mengubah sukrosa yang terdapat pada media fermentasi menjadi glukosa dan fruktosa, selanjutnya glukosa akan dikonversi menjadi asam asetat dan selulosa oleh bakteri asam asetat, asam organik lainnya yang dihasilkan adalah asam glukoronat dan asam laktat³⁴. Kumar & Joshi (2016) menyebutkan bahwa hasil dari metabolisme mikroba yaitu peningkatan jumlah proton H^+ dan akumulasi zat asam selama proses fermentasi akan membuat pH media atau larutan semakin menurun atau asam¹².

Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*

Daun sirsak merupakan salah satu herbal yang berpotensi sebagai antibakteri. Senyawa fenolik pada daun sirsak memiliki potensi sebagai antibakteri yang bekerja menghambat sintesis dinding sel pada membran sel, enzim, serta metabolisme yang terdapat pada sel⁹. Hasil penelitian tersebut berbeda dengan hasil penelitian yang oleh peneliti, yang menunjukkan bahwa rebusan daun sirsak dengan konsentrasi 100% tidak mempunyai potensi antibakteri. Hasil penelitian yang sama didapatkan dari penelitian yang dilakukan oleh Sari (2010) diduga karena bakteri gram negatif memiliki komponen penyusun dinding sel terdiri dari suatu lipid yang kompleks³⁵. Bahorun (2007) menyebutkan senyawa fenolik dari bagian tanaman memiliki afinitas berbeda tergantung sifat polaritas pelarut yang digunakan, sehingga dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri³⁶. Rebusan daun sirsak akan memiliki aktivitas antibakteri jika difermentasikan menjadi kombucha daun sirsak, karena kombucha menghasilkan komponen dengan berat molekul lebih rendah serta modifikasi polifenol oleh enzim yang dihasilkan SCOBY selama fermentasi berlangsung²⁵. Selain itu khamir memproduksi enzim-enzim diantaranya karboksilase, zymase, heksokinase, invertase, dehidrogenase, sedangkan bakteri asam asetat menghasilkan enzim dehidrogenase³⁷.

Hasil pengukuran daya hambat bakteri *Escherichia coli* oleh kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada lama fermentasi 7 hari didapatkan hasil yang tertinggi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol, dengan kategori kuat. Peningkatan kadar senyawa fenolik dan asam organik mempengaruhi aktivitas antibakteri kombucha daun sirsak^{12,16}. Menurut Simanjuntak (2011) perlakuan lama fermentasi 7 hari menghasilkan total asam dan senyawa fenolik paling tinggi, karena pada fase ini derajat keasaman dalam keadaan optimum, sehingga dapat memaksimalkan aktivitas bakteri dan khamir dalam menguraikan polifenol menjadi senyawa yang lebih sederhana¹⁵. Selain itu asam asetat yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri, asam asetat yang tidak terdiosisiasi mampu merusak struktur bilayer lipid, menyebabkan suasana sitoplasma menjadi asam sehingga terjadi denaturasi protein dan kehilangan energi². Aktivitas antibakteri juga dipengaruhi oleh probiotik atau bakteri asam laktat yang terdapat pada kombucha daun sirsak. Selama fermentasi bakteri asam laktat menghasilkan asam laktat, etanol dan karbondioksida³⁸. Bakteri asam laktat dapat mengendalikan bakteri patogen dalam saluran cerna dengan memproduksi bakteriosin³⁹. Bakteriosin merupakan protein aktif yang secara efektif memiliki kemampuan bakterisidal terhadap beberapa bakteri patogen. Mekanisme bakteriosin yaitu dengan cara meningkatkan permeabilitas membran menyebabkan gangguan keseimbangan barrier dan dapat mengakibatkan kematian sel⁴⁰. Mekanisme lain dari bakteriosin antara lain penghambatan germinasi spora

dan inaktivasi pembawa anionik membentuk pori-pori selektif dan non selektif⁴¹.

Semakin lama fermentasi menyebabkan potensi penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* menjadi semakin rendah. Lama fermentasi 14 hari dan 21 hari menyebabkan penurunan daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hasil fermentasi kombucha daun sirsak dipengaruhi oleh lamanya fermentasi berlangsung¹⁴. Lama fermentasi berkaitan dengan waktu yang diperlukan mikroba saat fase pertumbuhan dalam menghasilkan asam aetat dan produk lainnya⁴². Semakin lama fermentasi maka asam aetat yang dihasilkan meningkat dan pH semakin rendah. Hal ini berdampak pada kandungan senyawa fenolik kombucha daun sirsak, karena asam aetat akan berdifusi melalui membran sel serta menurunkan pH internal, aktivitas enzim yang dihasilkan mikroba terhambat sehingga kemampuan mikroba dalam memodifikasi polifenol terganggu serta mekanisme penguraian gula menjadi asam aetat dan etanol menurun^{16,32}. Terdapat waktu optimal yang diperlukan untuk meningkatkan senyawa fenolik⁴³. Menurut Adetuyi (2014) selama fermentasi, kompleks fenolik tersebut akan dihidrolisis oleh organisme starter, setelah itu terjadi penurunan kandungan senyawa tersebut⁴⁴. Semakin lama fermentasi khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang dihasilkan meningkat. Hal ini menyebabkan penurunan senyawa fenolik, karena membran sel *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan untuk mengadsorpsi komponen bioaktif yang terdapat pada suatu media⁴⁵.

Total bakteri asam laktat dipengaruhi oleh lama fermentasi, semakin lama fermentasi menyebabkan ketersediaan nutrient yang digunakan untuk biomassa menurun dan mulai terbentuk toksik. Setelah melewati waktu optimum terjadi penurunan bakteri asam laktat karena terjadi fase kematian atau terhenti pertumbuhannya⁴⁶. Penurunan total bakteri asam laktat juga dipengaruhi oleh akumulasi produk hasil metabolisme seperti asam-asam organik yang akan menurunkan pH larutan sehingga menghambat pertumbuhan bakteri asma laktat⁴⁷. Penurunan bakteri asam laktat mempengaruhi potensi daya hambat, karena produksi bakteriosin dihasilkan oleh bakteri asam laktat menurun, sehingga kemampuan bakteriosin dalam mengganggu potensial membran sel berkurang⁴⁸. Peningkatan lama fermentasi menyebabkan produksi bakteriosin berkurang karena bakteriosin terdeteksi maksimal pada fase stasioner. Pada fase stasioner bakteri asam laktat terjadi perubahan enzimatis yaitu prebakteriosin akan berubah menjadi bakteriosin yang aktif, apabila waktu inkubasi terlalu panjang menyebabkan aktivitas bakteriosin menurun karena terbasnya protease dari sel autolisis akibat bakteriosin yang terdegradasi⁴⁹.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Lama fermentasi mempengaruhi pH kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.).
2. Lama fermentasi kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.) mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

SARAN

Adapaun saran untuk meningkatkan penelitian ini di masa mendatang yaitu

1. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif pada kombucha daun sirsak tiap perbedaan lama fermentasi.
2. Perlu dilakukan optimalisasi waktu fermentasi kombucha daun sirsak

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti ucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mendanai penelitian, serta tim kelompok penelitian yang telah bekerjasama dalam membantu jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wistiana D, Zubaidah E. Karakteristik Kimiawi dan Mikrobiologi Kombucha dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2015;3(4):1446-1457.
2. Yanti NA, Ambardini S, Ardiansyah A, Marlina WOL, Cahyanti KD. Aktivitas Antibakteri Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dengan Konsentrasi Gula Berbeda. *Berkala Sainstek*. 2020;8(2):35-40.
3. Hrnjez D, Vaštag, Milanović S, Vukić V, Ilić M, Popović L, Kanurić K. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Foods*. 2014;10:336-345.
4. Muizuddin M, Zubaidah E. Studi Aktivitas Antibakteri Kefir Teh Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Dari Berbagai Merk Teh Daun Sirsak Dipasaran. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2015;3(4):1662-1672.
5. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based Analysis of the Bacterial and Fungal Compositions of Multiple Kombucha (Tea Fungus) Samples. *Food Microbiol*. 2014;38:171-8.
6. Widyaningsih EN. Peran Probiotik Untuk Kesehatan. *Jurnal Kesehatan*. 2011;4(1):14-20.
7. Ray B, Bhunia A. Fundamental food microbiology 4th edition. 2007. Washington D.C: Crc Press.
8. Ningsih DR, Zufahair, Kartika D. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak Sebagai Antibakteri. *Molekul*. 2016;11(1):101-111.
9. Permatasari GAA, Besung INK, Mahatmi H. Daya Hambat Perasan Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Indonesia *Medicus Vertinus*. 2013;2(2):162-169.

10. Suhardini PN, Zubaidah E. Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2014;4(1).
11. Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and Health: a review. *Food Res Int*. 2000;33:409-21
12. Kumar V, Joshi VK. Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *Intl J Food Ferment Technol*. 2016; 6(1):13-24.
13. Cholidah AI, Danu D, Nurrosyidah LH. Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Kombucha Rosela (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*. 2020;2(3):184-210.
14. Naland H. Kombucha: Teh dengan Seribu Khasiat. Depok: Agromedia. 2008:40-41p.
15. Simanjuntak R, Siahaan N. Pengaruh Konsentrasi Gula dan Lama Fermentasi terhadap Mutu Teh Kombucha. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Tinggi*. 2011;4(2):81-91.
16. Hassmy NP, Abidju J, Yudistira A. Analisis Aktivitas Antioksidan pada The Hijau Kombucha Berdasarkan Waktu Fermentasi yang Optimal. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2017;6(4):67-74.
17. Susilowati A. Perbedaan Waktu Fermentasi Dalam Pembuatan Teh Kombucha Dari Ekstrak Teh Hijau Lokal Arraca Kiara, Arraca Yakubita, Pekoe Dan Dewata Sebagai Minuman Fungsional Untuk Anti Oksidan. Prosiding SNST ke-4. Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim, Semarang. 2013.
18. Adri D, Hersoelistyorini W. Aktivitas Antioksidan dan Sifat Organoleptik Teh Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Berdasarkan Variasi Lama Pengeringan. *Jurnal Pangan dan Gizi*. 2013;4(7):1-12.
19. Kartikaputri SD. Potensi kombucha daun the (*camellia sinensis*) dan kombucha daun kopi robusta (*coffea robusta*) sebagai minuman probiotik. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. 2020.
20. Naland H. Kombucha: Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit. Depok: Agromedia Pustaka. 2004.
21. Sari F, Aryantini D. Karakter Spesifik Dan Pengaruh Pemberian Oral Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap Makroskopis Organ Hepar Tikus Wistar. *Jurnal Wiyata*. 2018;5(1):1-9.
22. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society For Microbiology*. 2012:1-13.
23. HiMedia Laboratories. Mueller Hinton Broth [internet]. Himedlabs. 2012. [cited 16 Maret 2021] Available from: <https://www.himedialabs.com/intl/en/products/Clinical-Microbiology/Susceptibility-Testing-Media/Mueller-Hinton-Broth-M391>.
24. Astawan M, Wresdiyati T, Arief II, Febiyanti D. Potensi bakteri asam laktat probiotik indigenus sebagai antidiare dan imunomodulator. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*. 2011;12(1):11-16.
25. Jayabalan R, Malbasa RV, Lonca ES, Sathishkumar M. A Review on Kombucha Tea Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014:13.
26. Rinihapsari E, Richter, CA. Fermentasi Kombucha dan Potensinya Sebagai Minuman Kesehatan. *Media Farmasi Indonesia*. 2013;3(2):241-246.
27. Susilowati W, Agustini I, Indriastuti. Uji Antibakteri Ekstrak Biji Alpokat (Persea Americana mill) dari Fraksi petroleum Eter. *Buletin Penalaran Mahasiswa*. 1997;3(2):48- 53.
28. Dalimarth S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 4. Jakarta: Puspa swara. 2006.
29. Warsa VC. Kokus Positif Gram Dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Binarupa aksara. 1994.
30. David and Stout. Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal Of Microbiology*. 1971;22:4-9.
31. Purwoko, Tjahjadi. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara. 2007.
32. Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzyme-Based Hydrolysis Process for Ethanol from Lignocellulosic Material. Review: *J. BioResources*. 2007;2(4):707-738.
33. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. Microbiology a human perspective. Edisi ke 5. New york: Mc Graw-Hill companies. 2007.
34. Hidayat. Mikrobiologi Industri. Yogyakarta: C.V Andi Offset. 2006.
35. Sari YD, Djannah SN, Nurani LH. Uji Aktivitas Antibakteri Rebusan Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Secara *in Vitro* Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. *KES MAS*. 2010;4(3):144-239.
36. Baborun T, Luximon-Ramma A, Crozier A. Arouma, OI. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004;84(12):1553-1561.
37. Aditiwati P, Kusnadi. Kultur Campuran dan Faktor Lingkungan Mikroorganisme yang Berperan dalam Fermentasi Tea – Cider. ITB *Sains dan Tek*. 2003;35A(2):147-162.
38. Usman NA, Suradi K, Gumilar J. Pengaruh Konsentrasi Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus Plantarum* Dan *Lactobacillus Casei* Terhadap Mutu Mikrobiologi Dan Kimia Mayones Probiotik. *Jurnal Ilmu Ternak*. 2018;18(2):79-85.
39. Bachrudin, Z., Astuti, & Dewi, Y. S. 2000. Isolasi dan Seleksi Mikroba Penghasil Laktat dan Aplikasinya Pada Fermentasi Limbah Industri

Tahu. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim Dan Bioteknologi Mikrobiologi Enzim*.

40. Jack R, Tanggandb WJ, Ray. Bacteriocin of gram positive bacteria. *Microbiol.* 1995;59:1416-1492.
41. Ray B, Bhunia. Fundamental food microbiology 4th edition. Washington D.C: Crc Press. 2007.
42. Kusuma GPAW, Nocianitri KA, Pratiwi IDPK. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik *Fermented Rice Drink* Sebagai Probiotik Dengan Isolat *Lactobacillus* sp. F213. *Jurnal Itepa.* 2020;9(2):182-193.
43. Widyapranata AN, Iwantoro FO, Halim L. Pengaruh Waktu Perebusan Dan Waktu Fermentasi Terhadap Peningkatan Total Senyawa Fenolik Dan Flavonoid Bir Ale. *FaST.* 2020;4(2):69-80.
44. Adetuyi FO, Ibrahim TA. Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activities of okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Nigerian Food Journal.* 2014;32(2):128- 137.
45. Nogueira A, Guyot S, Marnet N, Lequere JM, Drilleau J, Wosiacki G. Effect of Alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2008;51(5):1025-1032.
46. Edam M. Penengaruh Kombinasi Konsistensi NaCl dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Asam Laktat Dari Kubis (*Brassica oleracea*). *Jurnal Penelitian Teknologi Industri.* 2018;10(1):17-24.
47. Yuliana N. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolat T5 yang berasal dari tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian.* 2008;13(2):108-116
48. Fauziyah PN, Nurhajati J, Chrysanti. Daya Antibakteri Filtrat Asam Laktat dan Bakteriosin *Lactobacillus bulgaricus* KS1 dalam Menghambat Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* Strain ATCC 700603, CT1538, dan S941. *MKB.* 2014;47(1):35
49. Dride D, Fimland G, Hechard LM, McMullen, Prevost H. The Continuiningstory of class ii bacteriocins. *J.Microbiol. Mol. Biol.* 2006:562-582.